

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**ESPECIALIZACION EN SEGURIDAD ALIMENTARIA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

TITULO

**REQUISITOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS ANIMALES A SER UTILIZADOS EN
ENSAYOS CON FINES DE PRODUCCIÓN DE DATOS TOXICOLÓGICOS EN
PRODUCTOS FITOSANITARIOS, PARA LA INSCRIPCIÓN EN EL REGISTRO
NACIONAL DE TERAPÉUTICA VEGETAL ADMINISTRADO POR LA DIRECCIÓN
DE AGROQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE SENASA.**

NOMBRE DEL ALUMNO

Ing. Agr. Diego José CIANCAGLINI

NOMBRE DEL DIRECTOR

Dr. Miguel Angel AYALA

INDICE

1. Objetivo del estudio.....	4
2. Motivo de la elección del tema.....	4
3. Desarrollo.....	4
3.1 Marco Teórico.....	4
3.2 Estandarización de Animales de Laboratorio.....	5
3.3 Clasificación de los Animales de laboratorio de acuerdo a su carga microbiana.....	5
3.4 Microorganismos controlados en ratón.....	11
3.4.1 Virus.....	11
3.4.2 Bacterias.....	11
3.4.3 Parásitos, Endoparásitos, Protozoos.....	12
3.4.4 Nematodes.....	12
3.4.5 Cestodes.....	12
3.4.6 Ectoparásitos, Artrópodos, Acaros.....	12
3.4.7 Piojos.....	12
3.5 Microorganismos controlados en ratón.....	12
3.5.1 Virus.....	12
3.5.2 Bacterias.....	13
3.5.3 Parásitos, Endoparásitos, Protozoos.....	13
3.5.4 Nematodes.....	13
3.5.5 Cestodes.....	14
3.5.6 Ectoparásitos, Artrópodos, Ácaros.....	14
3.5.7 Piojos.....	14
3.5.8 Pulgas.....	14
3.6 Diseño del trabajo.....	14
3.7 Hipótesis.....	15

3.7.1 Laboratorios que poseen bioterio de producción, mantenimiento y bioterio de experimentación.....	15
3.7.2 Laboratorios que no producen sus propios animales.....	15
3.8 Animales de ensayo.....	17
3.9 Condiciones de alojamiento.....	17
3.10 Resultados.....	18
4. Conclusiones.....	19
5. Bibliografía.....	21

1. Objetivo del estudio

El objetivo del presente trabajo es establecer los parámetros ambientales, genéticos y microbiológicos que deben cumplir los animales para ser utilizados en ensayos toxicológicos, para la obtención de datos que definirán las bandas toxicológicas de los productos fitosanitarios sujetos a inscripción en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal, de SERVICIO NACIONAL DE SANIADAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA).

2. Motivo de la elección del tema

La utilización de animales sin estandarizar en ensayos de datos toxicológicos, derivan en resultados erróneos que podrían alterar los mismos en las pruebas científicas, arrojando bandas que no corresponden a los productos y utilizando un mayor número de animales.

3. Desarrollo

3.1 Marco Teórico

La ciencia del animal de laboratorio se puede definir como una rama multidisciplinaria dentro de las ciencias biológicas que contribuye al empleo humanitario de los animales en la investigación biomédica y a la obtención de datos reproducibles, confiables, comparables, imparciales e informativos.

Abarca el estudio de la biología de los animales de laboratorio, su manejo y requerimientos ambientales, los procedimientos de estandarización microbiológica y genética, la prevención y tratamiento de enfermedades, la optimización de técnicas experimentales y de técnicas de anestesia, analgesia y eutanasia. Esta ciencia

también incluye el estudio de los aspectos éticos de la experimentación animal junto con la búsqueda de procedimientos alternativos y complementarios.

El término "experimento con animales" puede aplicarse a cualquier procedimiento científico en el que se utilicen animales, con independencia de que sean vertebrados o invertebrados.

El objetivo principal de la ciencia del animal de laboratorio es contribuir a la calidad de la experimentación animal y al bienestar de los mismos.

La mayoría de los experimentos con animales se llevan a cabo en el ámbito de la ciencia agropecuaria, veterinaria, biológica y médica. Con frecuencia, en la biología, la ciencia veterinaria o la ciencia agropecuaria, los ensayos se diseñan con el objeto de recabar información relevante o significativa para el animal o para las especies animales con las que se ha llevado a cabo el experimento. Sin embargo, en la investigación médica y en las pruebas de seguridad, el animal se emplea casi siempre como modelo experimental para transpolar resultados al hombre.

3.2 Estandarización de los animales de laboratorio

Los animales de laboratorio, como reactivos biológicos vivos, deben ser estandarizados genética y microbiológicamente, y controlar los factores ambientales, macro y microambiente para que los resultados de la experiencia sean confiables.

La determinación del estado de salud y de la condición genética de los animales de experimentación que se utilizan como reactivos biológicos es la base y fundamento para la obtención de resultados confiables, reproducibles y comparables en las pruebas de diagnóstico, investigación y controles de calidad, en las que se requiera el uso de los mismos.

Aplicando procedimientos que establecen las normativas internacionales se puede cumplir con los objetivos generales de incrementar la calidad, reducir el número y reemplazar los animales en las experiencias. De esta manera se evitará la repetición

de las pruebas ya que esto significaría un gasto importante de dinero, de tiempo, y sobre todo una falta de responsabilidad desde el punto de vista ético y moral por el hecho de estar trabajando con seres vivos.

El uso de animales en estado de salud deficiente conduce irreversiblemente a la obtención de resultados erróneos.

En algunas ocasiones se crían y utilizan animales de laboratorio que albergan microorganismos patógenos en forma potencial y no se presta mayor importancia a su estatus microbiológico. Debido a la resistencia innata adquirida, éstos no siempre muestran signos clínicos por lo que estas infecciones inaparentes pueden conducir a errores de interpretación de los resultados en los experimentos.

Cuando un animal de laboratorio se usa como modelo animal se deben reducir al máximo las variables macro y microambientales, microbiológicas y de manejo de manera que estos factores no interfieran con los resultados de las experiencias. En muchos casos, estos animales portadores de dichas contaminaciones son los responsables de causar brotes epidémicos en los bioterios; por lo tanto el diagnóstico y detección de estos microorganismos se ha convertido en el objeto primario del control microbiológico de los animales de laboratorio.

3.3 Clasificación de los animales de laboratorio de acuerdo a su carga microbiana

Junto con el desarrollo y evolución de la ciencia de los animales de laboratorio se pudo comprobar que la presencia de parásitos y microorganismos patógenos en estos individuos puede provocar interferencias en los resultados de las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Por esta razón, los especialistas desarrollaron metodologías que se aplican para producir y mantener animales de los que selectivamente se han eliminado ciertos microorganismos, por lo que esto permite obtener individuos microbiológicamente definidos.

Estos animales deben ser producidos y mantenidos bajo barreras sanitarias, que son elementos que se interponen entre el medio externo y el medio interno donde se encuentra los animales. Estas pueden ser absolutas (como un autoclave de doble puerta, aislador) o relativas (como cambio de vestimenta, doble puerta).

En la década de los años 50 se normatizó y estandarizó el uso y la acreditación de estos animales internacionalmente, clasificándolos en categorías de acuerdo con la presencia o ausencia de microorganismos específicos de cada especie:

- Indefinidos: Son aquellos en los que no se conoce su carga microbiológica, nunca han sido controlados microbiológicamente Figura II. No se usan metodologías estrictas para su cría y manejo. No deben usarse para ningún fin (3).

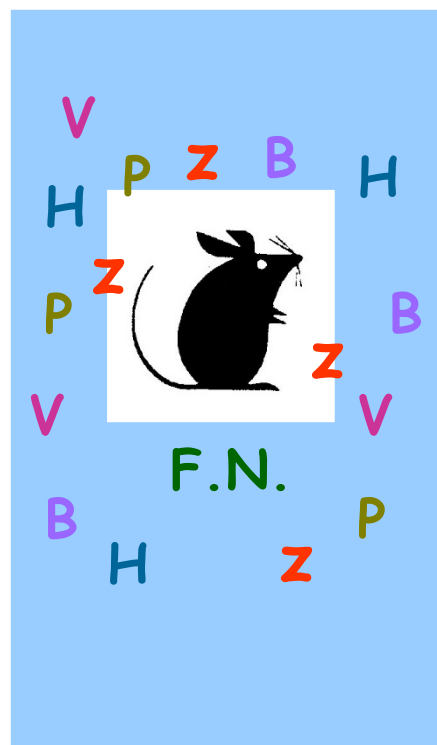


Figura II: Animales indefinidos

Referencias: Z: zoonosis, B: bacterias, V: virus, P: parásitos, H: Hongos y FN: Flora normal.

- Convencionales: criados y mantenidos en condiciones ambientales denominadas abiertas, eventualmente pueden ser portadores de infecciones, latentes o no, pero de ninguna manera zoonosis (3, 13, 15). Figura III.

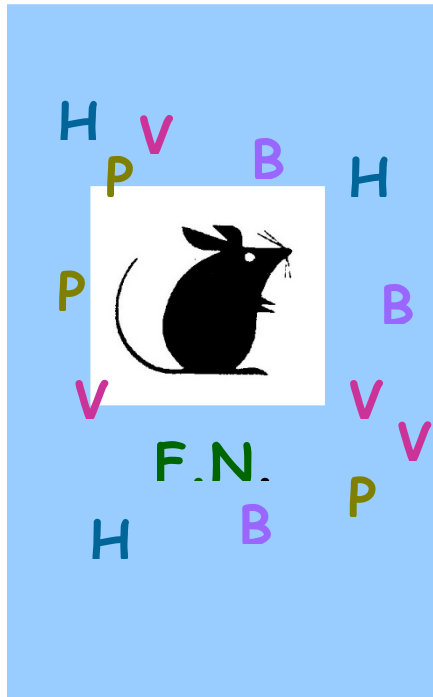


Figura III: Animales convencionales

Referencias: B: bacterias, V: virus, P: parásitos, H: Hongos y FN: Flora normal

- Libres de patógenos específicos y oportunistas SPOF (Specific Pathogen and Opportunist Free): Se obtienen por histerectomía aséptica y se crían y mantienen bajo barreras sanitarias. La técnica de histerectomía se fundamenta en la capacidad que tiene la placenta para filtrar la mayoría de los microorganismos, lo cual evita la transmisión vertical. Su flora intestinal es normal. Son animales que están libres de microorganismos y parásitos específicos. Se mantienen en instalaciones bajo barreras sanitarias y se controlan periódicamente de manera de acreditar tal condición (3, 13,15). Figura IV.



Figura IV Animales SPF

Referencias: B: bacterias, V: virus, P: parásitos, H: Hongos y FN: Flora normal.

- Libres de gérmenes o axénicos (G.F.A. Germ Free Animals): Son animales en los cuales no se pueden detectar ningún microorganismo, incluyendo los de la flora normal por los métodos hasta ahora conocidos. Son criados y mantenidos en ambientes totalmente estériles como por ejemplo: aisladores. También se obtienen por métodos de histerectomía (3, 13,15). Figura V

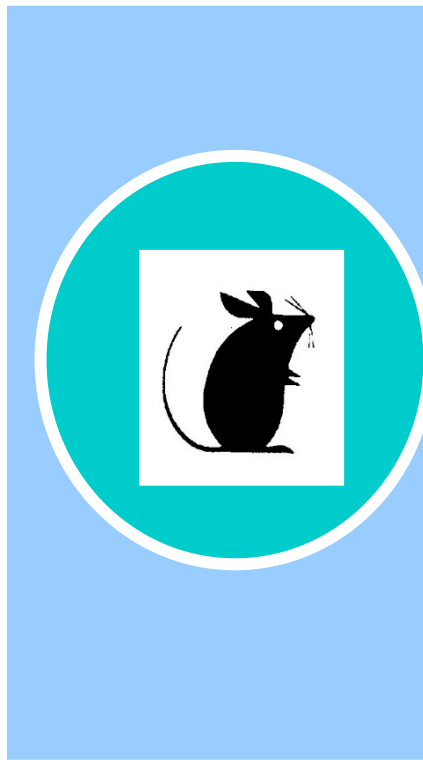


Figura V: Animales libres de Gérmenes

- Gnotobiotes (Gnotos: conocido, Biote: vida): Son animales axénicos o libres de gérmenes que se han puesto en contacto con uno o más cultivos puros de microorganismos Figura VI. Es decir que en estos animales conocemos totalmente la carga microbiana presente (3, 13,15).



Figura VI: Animales Gnotobiotes.

Referencias: E: microorganismos conocidos

Para establecer la categoría microbiológica a la cual pertenecen los animales se controla periódicamente el estado sanitario de las colonias aplicando métodos y recomendaciones establecidos internacionalmente. (1, 2, 3)

Los microorganismos recomendados para el control de ratas y ratones por la Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) son los siguientes:

3.4 Microorganismos controlados en ratón (14)

3.4.1 Virus

• Virus de la hepatitis del ratón (MHV)
• Rotavirus (EDIM)
• Virus diminuto del ratón (MVM)
• Virus de la neumonía del ratón (PVM)
• Virus Sendai (HVJ)
• Virus de la encefalomyelitis (Enfermedad de Theiler)
• Virus de la Ectromelia
• Virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCV)
• Adenovirus Tipo 1 (FL)
• Adenovirus Tipo 2 (K87)
• Citomegalovirus (CMV)
• Reovirus tipo 3 (REO 3)

3.4.2 Bacterias

• Citrobacter rodentium
• Clostridium piliforme
• Corynebacterium kutscheri
• Mycoplasma spp
• Pasteurella pneumotropica
• Salmonella spp.
• Streptococcus β haemolytic
• Streptococcus pneumoniae
• Helicobacter spp.
• Streptobacillus moniliformis
• Klebsiella pneumonia
• Klebsiella oxytoca
• Proteus mirabilis

3.4.3 Parásitos, Endoparásitos, Protozoos

• Spironucleus muris

• Giardia muris
• Trichomona muris
• Cryptosporidium spp.
• Eimeria spp
• Isospora spp.

3.4.4 Nematodes

• Syphacia obvelata
• Aspiculuris tetraptera
• Heterakis spumosa
• Nippostrongylus muris
• Capillaria hepática

3.4.5 Cestodes

• Himenolepis nana
• Himenolepis diminuta
• Cysticercus fasciolaris

3.4.6 Ectoparásitos, Artrópodos, Ácaros

• Myobia musculis
• Myocoptes musculinus
• Radfordia affinis

3.4.7 Piojos

• Poliplax serrata
• Pulgas
• Xenopsylla cheopis
• Nosopsyllus fasciatus
• Leptosylla segnis

3.5 Microorganismos controlados en rata (14)

3.5.1 Virus

• Virus Kilham de la rata (KRV)
• Parvovirus de la rata (RPV)
• Virus Toolan's H-1 de la rata (TRV)
• Virus de la neumonía del ratón (PVM)
• Virus Sendai (HVJ)
• Virus de la sialodacrioadenitis (SDAV)
• Coronavirus de la rata (CVR)
• Virus Hantan
• Adenovirus Tipo 1 (FL)

• Adenovirus Tipo 2 (K87)
• Reovirus tipo 3 (REO 3)

3.5.2 Bacterias

• Bordetella bronchiseptica
• Clostridium piliforme
• Corynebacterium kutscheri
• Mycoplasma spp
• Pasteurella pneumotropica
• Salmonella spp.
• Streptococcus β haemolytic
• Streptococcus pneumoniae
• Helicobacter spp.
• Streptobacillus moniliformis
• Klebsiella pneumonia
• Klebsiella oxytoca
• Proteus mirabilis

3.5.3 Parásitos, Endoparásitos, Protozoos

• Spironucleus muris
• Giardia muris
• Trichomona muris
• Cryptosporidium spp.
• Eimeria spp.
• Isospora spp.

3.5.4 Nematodes

• Syphacia muris
• Aspiculuris tetraptera
• Heterakis spumosa
• Nippostrongylus muris
• Capillaria hepatica
• Trichosomoides crassicauda

3.5.5 Cestodes

• Himenolepis nana

• Himenolepis diminuta
• Cysticercus fasciolaris

3.5.6 Ectoparásitos, Artrópodos, Ácaros

• Myobia musculis
• Myocoptes musculus
• Radfordia ensifera
• Laelaps echidninus
• Notoedres muris

3.5.7 Piojos

• Polyplax spinulosa

3.5.8 Pulgas

• Xenopsylla cheopis
• Nosopsyllus fasciatus
• Leptopsylla segnis

3.6 Diseño del trabajo

El Plan se basa en definir claramente los requerimientos de los animales, su implicancia en la determinación de las bandas toxicológicas como así también relevar los antecedentes nacionales e internacionales, mostrando cuales son las falencias respecto a dicho tema, situación actual y sus perspectivas.

Como resultado se busca tener un trabajo que analice y recopile información actual respecto al tema y que sirva de disparador para futuras investigaciones o normativas alrededores de los animales utilizados con fines científicos.

Asimismo, se prevé la elaboración de una futuro proyecto de norma tendiente incluir los requisitos de las conclusiones del presente trabajo.

3.7 Hipótesis

El único marco regulatorio con respecto a la temática sobre bioterios del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, es la Resolución SENASA N° 617/02, en su Art. 5° que establece las condiciones que deben cumplir los bioterios en los siguientes ítems:

3.7.1 Laboratorios que poseen bioterio de producción, mantenimiento y bioterio de experimentación

1 - Área de producción y mantenimiento: sala de cría o producción, sala de mantenimiento o stock, sala de experimentación animal, sala de cuarentenas.

2 - Área de depósito: depósito de material limpio, depósito de alimentos, depósito de material estéril.

3 - Área de lavadero

3.7.2 Laboratorios que no producen sus propios animales

Que incluye los siguientes ítems:

- Condiciones generales de limpieza y mantenimiento de los animales
- Alimentación
- Disposición de excretas y otros contaminantes
- Calidad genética
- Calidad sanitaria
- Personal afectado al bioterio
- Condiciones generales del medio ambiente para cría y mantenimiento de roedores y peces
- Condiciones generales del medio ambiente para cría y mantenimiento de aves y conejos
- Condiciones ambientales para cada especie

Asimismo, la resolución SENASA N° 816/06, establece los requisitos de etiquetado de los productos formulados de uso agrícola, inscriptos en el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal, que se comercializan y utilizan en la totalidad del territorio nacional.

Existen 4 bandas toxicológicas. Las mismas son:

Clase Ia: Sumamente peligrosa	Muy Tóxico	Rojo	Muy Tóxico
Clase Ib: Muy peligrosa	Tóxico	Rojo	Tóxico
Clase II: Moderadamente Peligroso	Nocivo	Amarillo	Nocivo
Clase III: Poco Peligroso	Cuidado	Azul	Cuidado
Clase IV: No ofrece Peligro	Cuidado	Verde	Cuidado

Los colores de las bandas toxicológicas (rojo, azul, amarillo y verde) correspondiente a la “Clasificación toxicologica según riesgos y valores de DL 50 aguda de productos formulados” establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se ubican en la parte inferior de las etiquetas de los productos fitosanitarios y son el resultado de los ensayos toxicológicos realizados con los animales de laboratorio.

Las bandas toxicológicas con los correspondientes pictogramas ubicados sobre las mismas y las frases de advertencia, definen cuales son los cuidados que hay que tener en cuenta, en lo que respecta a la protección personal que aplica los productos fitosanitarios y al ambiente donde los mismos son utilizados.

Se considera que disponer de un proyecto de normativa, como el que se desea elaborar con las conclusiones del presente trabajo, asegurará que los resultados arrojados por los ensayos toxicológicos con fines de registro sean más exactos, no incluyendo errores ni desviaciones provocados por la falta de estandarización de datos de los animales a ser utilizados.

3.8 Animales:

Se utilizaron 70 ratas de 8 a 12 semanas de edad de ambos sexos divididas de a 10 para cada ensayo.

De los 70 animales utilizados, 30 pertenecían al stock Sprague Dawly Crl:CD(SD); el origen de 20 de ellas era Charles River Laboratory, el resto pertenecía al Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Diez (10) de los 70 pertenecían a la cepa Wistar cuyo origen era el Laboratorio de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

El resto de los animales no tenían certificado de origen y solamente se nombraban como ratas albinas.

3.9 Condiciones de alojamiento:

Las ratas del stock Sprague Dawly y de la cepa Wistar se mantuvieron alojadas bajo condiciones estándar. La habitación de las mismas se mantuvo con temperatura controlada entre 22 +/- 2°C, registrada en las planillas correspondientes. La humedad se mantuvo entre 30 y 70% y se realizaron de 10 a 15 recambios de aire por hora.

Los animales se sometieron a fotoperíodos de 12 horas luz - 12 horas oscuridad. Los animales se colocaron en jaulas de alambre galvanizado y bandeja plástica, con cama de viruta limpia controlada microbiológicamente.

Se administro diariamente *ad libitum*, la siguiente dieta: Alimento balanceado Rata-Ratón marca GANAVE y agua potable. Se dio cumplimiento a las condiciones que deben cumplir los bioterios establecidos por la resolución SENASA N° 617/02.

Del resto de los animales no se informaron las condiciones de alojamiento por lo que no cumplieron con las normativa vigente.

Rata Wistar



Rata Sprag- Dawley



3.10 Resultados:

Se analizaron diferentes trabajos en donde se utilizaron animales para los ensayos toxicológicos donde se observó:

Ensayo 1, 2, 3 y 4, se utilizaron animales definidos se observó que usaron un menor número de animales y no hubo necesidad de repetir el ensayo,

los animales llegaron con certificado de calidad genética y sanitaria y se mantuvieron en un ambiente controlado de acuerdo a las normativas internacionales y la resolución SENASA N° 617/02.

En el ensayo N° 4 los animales utilizados no estaban definidos, ya que no presentaron certificado de origen calidad genética y sanitario, por lo que utilizaron un alto N° de animales repitiendo varias veces el ensayo. No se encontraba especificado el manejo ambiental y manipulación de las ratas, por lo que no cumplían con las normativas internacionales establecidas.

4. CONCLUSIONES:

Los productos fitosanitarios son una herramienta clave para asegurar la germinación, crecimiento, floración y fructificación de los cultivos con fines alimentarios.

El propósito de utilización de un producto fitosanitario aprobado por el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal de SENASA, es el control de la plaga agrícola (insecto, hongo, malezas, etc.) para la cual se aplica, respetando la dosis el modo y el momento de aplicación.

Asimismo, es de interés nacional y regional proteger la salud y el ambiente confirmando la seguridad de los productos fitosanitarios que actualmente se utilizan en los cultivos de la República Argentina.

La protección del medio ambiente, la salud de los consumidores y de los agricultores, se ve reflejado en el uso apropiado de las sustancias químicas. Dicha protección se extiende, desde el meticuloso mejoramiento, preparación y aplicación hasta la eliminación de producto fitosanitario en sus diversas formas.

Los riesgos que presentan los ingredientes activos y las formulas de los productos fitosanitarios convencionales han sido ampliamente investigados, definiéndose los niveles residuales seguros. Ninguna evidencia sugiere que las

mezclas de productos fitosanitarios signifiquen algún riesgo importante por encima de lo que ya se conoce sobre los componentes individuales.

Aplicando correctamente, los productos fitosanitarios permiten conservar las estructuras del suelo y reducir la necesidad de labranza. Asimismo, el uso de productos fitosanitarios mejora la productividad de las cosechas y hace posible un uso más efectivo del suelo, beneficiando la biodiversidad en el campo y las áreas circundantes.

La aplicación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) ayuda a reducir al mínimo los niveles de productos de protección de cultivos en el suelo y en las aguas superficiales. Los métodos de BPA comprenden el uso de las mejores técnicas disponibles a fin de garantizar la aplicación más precisa posible de los productos, la reducción de la dispersión del rociado, etc.

La resolución SENASA N° 816/06, obliga las empresas que producen, exportan/importan productos fitosanitarios a comercializarlos con sus correspondientes etiquetas. Las mismas deben estar escritas en el idioma oficial argentino que es el español.

La distribución de la información contenida en las etiquetas también esta reglamentada, diferenciándose tres cuerpos o sectores.

Todas las etiquetas deben tener en su parte inferior la banda de color que identifica la categoría toxicológica del producto fitosanitario.

La categoría toxicológica es el resultado de estudios de Toxicidad Aguda Oral y Toxicidad Aguda Dermal, mediante la utilización de animales de laboratorio.

Los animales de laboratorio, como reactivos biológicos vivos, deben ser estandarizados genética y microbiológicamente, y controlar los factores ambientales, macro y microambiente para que los resultados de la experiencia sean confiables, reproducibles y comparables.

El objetivo principal de la ciencia del animal de laboratorio es contribuir a la calidad de la experimentación animal y al bienestar de los mismos.

Se concluyó que para la realización de estudios toxicológicos con fines de registro se deben utilizar animales definidos por lo que se debe conocer su estado sanitario, genético y el manejo ambiental de los mismos.

Se considera que disponer de un proyecto de normativa, que incluya los parámetros de estandarización genética y microbiológica, control de los factores ambientales, macro y microambiente, asegurará que los resultados arrojados por los ensayos toxicológicos con fines de registro sean más exactos, no incluyendo errores ni desviaciones provocados por la falta de estandarización de datos de los animales a ser utilizados.

De igual manera se considera que se dará cumplimiento a las tres R, con los objetivos generales del refinamiento del ensayo, reducir el número y reemplazar a los animales en las experiencias por métodos alternativos.

Bibliografía

- 1- American Association for Laboratory Animal Science
<http://www.aalas.org/index.aspx>.
- 2- American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM).
Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, Columbia Inn, Columbia, MD.
1990.
- 3- Ayala Miguel. Estudio de la enfermedad de Tyzzer en diferentes cepas de ratas y ratones de laboratorio infectados experimentalmente. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2009.

4- Ayala M., Cagliada P., Milocco S., Carriquiriborde M., Gentil F., Maschi F., Principi M., Carbone C.. Estudio de la interferencia causada por *Pseudomonas aeruginosas* en ratones BALB/c transplantados con la línea tumoral humana A549. LVI Reunión Anual Sociedad de Investigación Clínica; Reunión Científica Anual 2011 Sociedad Argentina de Fisiología; II Congreso Nacional y IV Reunión Científica Regional de Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio. 16 al 19 de noviembre de 2011. Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

5- Ayala M., Laborde J., Milocco S., Carriquiriborde M., Cagliada P., Gentil F., Maschi F., Principi G., Carbone C.. Infección experimental con patógenos oportunistas en ratones inmunodeficientes trasplantados con la línea tumoral A 549. VII Congreso SADEBAC. 18 al 20 de junio, 2012. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

6- Ayala M., Laborde J., Milocco S., Carriquiriborde M., Cagliada P., Gentil F., Maschi F., Principi G., Carbone C.. Study of The Interference Produced by *Klebsiella oxytoca* in BALB/c caNN mice transplated with the human tumor line A549. XII Congresso Sociedade Brasileira de Ciencias em Animais de Laboratório. 14 al 16 de marzo de 2012. FOZ do IGUAÇU. Brasil.

7- Ayala M., Milocco S., Laborde J., Cagliada C., Carriquiriborde M., Gentil F., Carbone C.. Estudio de la interferencia causada por *Sthaphilocco aureus* en ratones de la cepa BALB/c-CAnN.Cg-Foxn1^{nu} trasplantada con la línea tumoral humana A549. I Congreso de la Asociación Uruguaya de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AUCyTAL). 12 y 13 de abril de 2013. Punta del Este, Uruguay.

- 8- Carbone C., Cagliada P., Ayala M.. Acción Patógena Experimental. En: Microbiología Veterinaria. Capítulo 15, Pág. 121 a 135. 2ª Edición. Editor: Néstor Stanchi. Argentina. ISBN: 978-950-555-321-1. 2007.
- 9- Federation Of European Laboratory Animal Science Associations.
<http://www.felasa.org/>
- 10- Institute for Laboratory Animal Research.
http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/
- 11- International Council for Laboratory Animal Science.
<http://www.iclas.org/>
- 12- Lab Animal. <http://www.labanimal.com/labanimal/index.html>
- 13- Milocco S., Ayala M.. Los animales de laboratorio y las zoonosis. En: Temas de Zoonosis IV. Sección Zoonosis en Animales de Vida Libre y de Laboratorio, Capítulo 46. Comité Editorial: Cacchione R., Durlach R., Martino P.. ISBN: 978-987-97038-3-0. 2008.
- 14- National Research Council. Education and training in the care and use of laboratory animals: a guide for developing institutional programs. National Academy Press. Washington D.C.. 1991.
- 15- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. U.S.A.. 2002.
- 16- Necropsia del ratón.
http://www.eulep.org/Necropsy_of_the_Mouse/index.php
- 17- Necropsia del ratón. <http://www.geocities.com/virtualbiology/>
- 18- Necropsy. <http://www.geocities.com/virtualbiology/necropsy.html>

- 19- Office of Laboratory Animal Welfare.
<http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>
- 20- SENASA Resolución N° 350 del 30 de agosto de 1999.
- 21- SENASA Resolución N° 617 del 18 de julio de 2002.
- 22- Stanchi N.O. y col. Microbiología veterinaria. Editorial Intermédica, 2007. Cap. 15.
- 23- Taconic Laboratory. <http://www.lal.org.uk/> <http://www.taconic.com/>
- 24- The Canadian Council on Animal Care. <http://www.ccac.ca/>
- 25- The International Journal of Laboratory Animal Science and Welfare. <http://www.lal.org.uk/>
- 26- The Jackson Laboratory. <http://www.jax.org/>
- 27- The UFAW Handbook on the Care and management of laboratory Animals. 6th ed. Universities Federation for Animal Welfare. Churchill and Livingstone. New York. 1987.
- 28- Tuffery A.A.. Laboratory Animals. John Wiley. London. 1995.
- 29- Van Zutphen L.F.M., Baumans V., Beynen A.C.. Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio. ELSEVIER. 1999.
- 30- Van Zutphen L.F.M, Balls M. Animal Alternatives, Welfare and Ethics. Elsevier. The Netherlands. 1997.
- 31- Zuñiga Jesús M., Tur Marí Josep A., Milocco Silvana N., Piñeiro Ramón. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. McGraw-Hill Interamericana. 2001.

32- Zuñiga Jesús M., Tur Marí Josep A., Orellana J. M.. Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio. Volúmenes I y II. Universidad de Alcalá. Sociedad Española para la Ciencia de Animales de Laboratorio (SECAL). 2009.